

参蛤散对腹主动脉缩窄心力衰竭大鼠心功能的影响

朱灵妍, 魏易洪, 杨娟, 林赞霄, 曹敏, 王佑华, 苑素云, 周端*
(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: **目的** 研究参蛤散(生晒参、蛤蚧)对腹主动脉缩窄心力衰竭大鼠心功能的影响及其作用机制。**方法** 心力衰竭大鼠给予参蛤散 [1.89 g/(kg·d)] 或比索洛尔 [1 mg/(kg·d)], 给药 12 周后, 观察假手术组、模型组、参蛤散组、比索洛尔组病理形态、血流动力学、心超指数及对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (PGC-1 α) 蛋白表达的影响。**结果** 与模型组比较, 参蛤散升高射血分数 (EF) ($P < 0.05$), 降低左室舒张末压 (LVEDP) ($P < 0.01$), 改善左室压力最大上升速率 (dp/dt_{max}) 和左室压力最大下降速率 (dp/dt_{min}) ($P < 0.01$), 减少心肌组织病变和心肌纤维化。模型组与参蛤散组 PGC-1 α 蛋白表达无显著差异。**结论** 参蛤散能改善心力衰竭大鼠左室功能, 减少心肌组织病变。

关键词: 参蛤散; 心力衰竭; PGC-1 α ; 线粒体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1766-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.002

Effects of Shenge Powder on heart function in rats with heart failure by coarctation of abdominal aorta

ZHU Ling-yan, WEI Yi-hong, YANG Juan, LIN Yun-xiao, CAO Min, WANG You-hua, YUAN Su-yun, ZHOU Duan*

(Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Shenge Powder (*Ginseng Radix et Rhizoma*, *Gecko*) on heart function in rats with heart failure by coarctation of abdominal aorta and its mechanism of action. **METHODS** The heart failure rats were fed with Shenge Powder [1.89 g/(kg·d)] or bisoprolol [1 mg/(kg·d)] for twelve weeks. The pathological morphology, hemodynamics, cardiographic index and effect on protein expression of PGC-1 α in sham operation group, model group, Shenge Powder group and Bisoprolol group were observed. **RESULTS** Compared with the model group, Shenge Powder increased ejection fraction (EF) ($P < 0.05$), decreased left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) ($P < 0.01$), improved maximal rate of left ventricular pressure development (dp/dt_{max}) and maximal rate of left ventricular pressure decay (dp/dt_{min}) ($P < 0.01$), reduced myocardial tissue lesions and myocardial fibrosis. There was no significant difference in PGC-1 α protein expression between the Shenge Powder group and the model group. **CONCLUSION** Shenge Powder can improve left ventricular function in rats with heart failure, and reduce the pathological changes of myocardium tissue.

KEY WORDS: Shenge Powder; heart failure; PGC-1 α ; mitochondria

随着人口老龄化进程的加快和高血压、冠心病等心血管疾病发病率的升高, 心力衰竭的患病率逐年上升。心脏作为人体高耗能器官, 代谢旺盛, 心

肌细胞需要大量、持续的能量供应来保证正常的舒缩功能, 而所需能量的 90% 由“产能工厂”——线粒体提供^[1-2], 其增殖以及合成过程是细胞实现自

收稿日期: 2017-01-13

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAI41B05); 国家自然科学基金青年基金 (81202660); 上海市“杏林新星”计划 (ZYSNXD011-RC-XLXX-20130001)

作者简介: 朱灵妍 (1988—), 女, 博士生, 研究方向为中西医结合防治慢性心力衰竭。E-mail: qqxzz96@live.cn

* **通信作者:** 周端 (1950—), 男, 主任医师, 博士生导师。E-mail: zhouduan@126.com

我更新和调控的重要机制。当机体处于一定的运动强度或冷热刺激、氧化应激等条件下时,线粒体开始分裂、分化,随之带来线粒体大小、数量以及质量的改变,最终引起心肌肥大、心力衰竭等心血管疾病的发生。

过氧化物酶体增植物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferation activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α) 是心脏线粒体生物合成的重要调节因子,主要分布在氧化活性高的器官和组织,参与核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 及线粒体 DNA (mtDNA) 的调控。PGC-1 α 的激活参与脂肪酸氧化、葡萄糖利用及氧化磷酸化的过程,调控下游细胞核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factors 1, NRF1)、雌激素相关受体 (estrogen-related receptor, ERR)、过氧化物酶体增植物激活受体 α (peroxisome proliferation activated receptor α , PPAR α) 等^[3]。因此,本研究通过观察腹主动脉缩窄大鼠心肌组织病理形态、血流动力学、心超指数及对 PGC-1 α 、PPAR α 、NRF1 蛋白表达的影响,探讨参蛤散对心力衰竭大鼠心功能的影响,以及对线粒体生物合成、能量生成的改善作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 (200 $\pm$ 20) g Wistar 大鼠 48 只,SPF 级,由上海中医药大学动物实验中心提供,动物合格证号 SCXK (京) 2012-0001。饲养条件:室温 22 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50% ~ 60%,12 h/12 h 明暗。

1.1.2 药物 参蛤散由生晒参(生产批号 140619)、蛤蚧(生产批号 XD14101903)组成,购自上海雷允上总店,打粉过 100 目筛,按 3 : 1 质量比例混合,溶于双蒸水制成 200 mg/mL 混悬液,低温保存备用,成人参蛤散每日用量 3 g/50 kg,按成人与大鼠系数折算成大鼠用量 0.378 g/kg,根据生药粗制剂剂量可提高 3 ~ 5 倍,确定终剂量为 1.89 g/kg;富马酸比索洛尔(康忻,5 mg,德国默克公司,生产批号 184092),溶于双蒸水制成 0.3 mg/mL 混悬液,按成人与大鼠系数折算成大鼠用量 1 mg/kg。

1.1.3 试剂与仪器 兔抗大鼠 PGC-1 α (ab54481)、PPAR α (ab8934)、NRF1 (ab175932) 一抗购自美国 Abcam 公司;兔抗大鼠 β -Actin (4970) 一抗购自美国 CST 公司;山羊抗兔二抗购自碧云天生物技术研究所。大鼠脑利钠肽 (brain natriuretic pep-

tide, BNP)、醛固酮 (aldosterone, ALD)、血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) ELISA 试剂盒(货号 H166、H188、H185) 购自南京建成生物技术公司。GE Vividi 便携式心脏彩超;PowerLab/8SP 生物信号处理和分析系统;LEICA RM2235 型轮转切片仪;EG1150H + C 型石蜡包埋机;Nikon Eclipse Tiu 倒置显微镜;BioTek Synergy H1MF 型酶标分析仪;Bio-Rad Mini Protean Tetra system 型电泳系统;Trans-Blot SD 型半干转印系统;Chemi Doc MP 型凝胶成像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 分组造模与给药 雄性 Wistar 大鼠适应性喂养 5 d,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、参蛤散组、比索洛尔组,每组 12 只,各组大鼠苦味酸标记。3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,参照文献 [4-5] 建立腹主动脉缩窄致心力衰竭大鼠模型,术后腹腔注射青霉素。自造模术后 5 d 开始给药,分别予参蛤散 [1.89 g/(kg $\cdot$ d)] 灌胃,每日 1 次;比索洛尔 [1 mg/(kg $\cdot$ d)] 灌胃,每日 1 次,连续 12 周。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 一般情况 给药期间模型组、参蛤散组各死亡 1 只大鼠。模型组大鼠逐渐活动减少,精神萎靡,毛发稀疏无光泽;治疗组大鼠精神尚可,活动能力无明显异常,毛发无明显减少。

1.2.2.2 超声心动图 大鼠禁食不禁水 12 h,肝素钠 1 200 U/kg 抗凝 15 min,3% 戊巴比妥钠 (3 mL/kg) 麻醉后胸部剃毛,涂耦合剂,调整探头至左室长轴切面,M 型模式下行超声心动图检测。

1.2.2.3 血流动力学测定 大鼠麻醉状态下,分离右侧颈总动脉,插管,稳定 10 min 后记录动脉压力,然后将导管轻轻送入左心室,经多导生理记录仪测量。

1.2.2.4 病理形态学 心肌组织经多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,厚度 5 μm ,常规 HE、Masson 染色,光学显微镜观察。

1.2.2.5 BNP、ALD、Ang II 测定 心超、血流动力学检测结束后,腹主动脉采血,离心 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检,按照 ELISA 试剂盒说明书测定。

1.2.2.6 Western blot 检测 PGC-1 α 、PPAR α 、NRF1 蛋白表达 腹主动脉采血结束后,留取心肌组织,-80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,匀浆,提取蛋白,BCA 法

测定蛋白质含有量, 95 ℃变性 5 min 后 SDS-PAGE 电泳, 半干转法转膜, 5% 牛奶封闭, 4 mL 一抗 (PGC-1 α 1 : 1 000、PPAR α 1 : 1 000、NRF1 1 : 1 000) 4 ℃过夜, 5 mL 二抗 (1 : 2 000) 室温 1 h, 凝胶成像系统扫描, 蛋白表达量以光密度值的相对比值表示。

1.3 统计分析 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间采用单因素方差分析进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

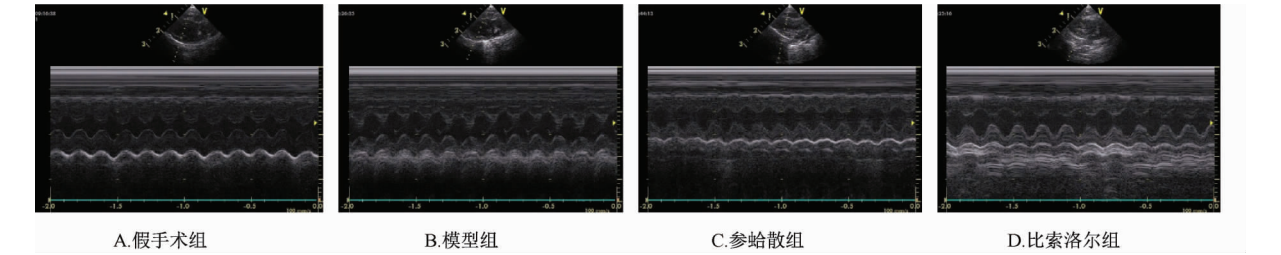


图 1 各组大鼠超声心动图
Fig. 1 Echocardiography images of rats in various groups

表 1 各组大鼠超声心动图指标 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IVSd/mm	LVPWd/mm	LVD/mm	EDV/mL	ESV/mL	EF/%	FS/%	SV/mL
假手术组($n=12$)	2.355 $\pm$ 0.337 1	2.245 $\pm$ 0.362 5	6.220 $\pm$ 0.961 3	0.506 3 $\pm$ 0.183 90	0.051 00 $\pm$ 0.031 78	92.14 $\pm$ 3.801	60.20 $\pm$ 7.690	0.536 0 $\pm$ 0.214 30
模型组($n=11$)	2.421 $\pm$ 0.364 6	2.350 $\pm$ 0.312 5	6.031 $\pm$ 0.422 1	0.538 0 $\pm$ 0.067 95	0.088 18 $\pm$ 0.036 01 *	82.75 $\pm$ 5.218 **	46.67 $\pm$ 6.039 **	0.428 2 $\pm$ 0.084 12
参蛤散组($n=11$)	2.356 $\pm$ 0.388 2	2.167 $\pm$ 0.552 8	5.932 $\pm$ 0.642 0	0.500 9 $\pm$ 0.144 00	0.063 64 $\pm$ 0.033 25	87.72 $\pm$ 3.943 Δ	52.59 $\pm$ 5.336 *	0.436 4 $\pm$ 0.120 70
比索洛尔组($n=12$)	2.311 $\pm$ 0.349 6	2.179 $\pm$ 0.333 8	5.779 $\pm$ 0.710 5	0.469 0 $\pm$ 0.149 80	0.058 00 $\pm$ 0.020 44	88.00 $\pm$ 2.467 Δ	52.63 $\pm$ 3.482 *	0.411 0 $\pm$ 0.131 50

注:IVSd 为舒张期室间隔厚度, LVPWd 为舒张期左室后壁厚度, LVD 为舒张期左室内径, EDV 为舒张期左室末容积, SV 为每搏量。与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠血流动力学变化 见表 2。与假手术组相比, 模型组收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、左室收缩压 (left systolic blood pressure, LVSP)、左室舒张末期压力 (LVEDP) 上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 左室压力最大上升速率 (maximal rate of ventricular pressure development, $dp/dt_{\max}$)、左室压力最大下降速率 (maximal rate of ventricular pressure decay, $dp/dt_{\min}$) 均有明显下降 ($P < 0.01$), 说明造模成功; 与模型组相比, 参蛤散组 LVEDP 显著下降 ($P < 0.01$), 而 $dp/dt_{\max}$ 、 $dp/dt_{\min}$ 明显上升 ($P < 0.01$), 提示参蛤散能改善左室收缩、舒张功能; 比索洛尔组降低 SBP、DBP、LVEDP、作用显著, 降压效果明显。

表 2 各组大鼠血流动力学指标 ($\bar{x} \pm s$, 1 mmHg = 0.133 kPa)

组别	HR/ bpm	SBP/ mmHg	DBP/ mmHg	LVSP/ mmHg	LVEDP/ mmHg	($dp/dt_{\max}$)/ (mmHg·s ⁻¹)	($dp/dt_{\min}$)/ (mmHg·s ⁻¹)
假手术组($n=12$)	365.8 $\pm$ 39.04	119.4 $\pm$ 15.08	93.25 $\pm$ 18.100	138.8 $\pm$ 17.78	14.71 $\pm$ 2.494	6 877 $\pm$ 975.8	4 974 $\pm$ 510.5
模型组($n=11$)	373.6 $\pm$ 47.01	153.2 $\pm$ 13.01 **	123.4 $\pm$ 10.140 **	159.6 $\pm$ 19.27 **	22.06 $\pm$ 6.912 **	5 620 $\pm$ 601.2 **	4 422 $\pm$ 632.5 **
参蛤散组($n=11$)	374.0 $\pm$ 24.33	141.6 $\pm$ 8.039 ** Δ	114.4 $\pm$ 7.801 **	160.8 $\pm$ 19.30 **	14.87 $\pm$ 3.212 $\Delta\Delta$	6 771 $\pm$ 978.1 $\Delta\Delta$	5 435 $\pm$ 561.5 * $\Delta\Delta$
比索洛尔组($n=12$)	366.4 $\pm$ 44.84	138.3 $\pm$ 19.98 ** $\Delta\Delta$	110.1 $\pm$ 22.730 ** Δ	151.6 $\pm$ 17.89	14.30 $\pm$ 2.304 $\Delta\Delta$	5 962 $\pm$ 215.6 * $\Delta\Delta\Delta$	4 480 $\pm$ 283.8 * $\Delta\Delta\Delta$

注:与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与参蛤散组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠心肌组织病理学改变 心肌组织 HE 染色光镜下显示, 模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 细胞核增大畸形, 胞浆着色深; 参蛤散组、比索洛

2 结果
2.1 参蛤散对各组大鼠超声心动图 (图 1) 指标的影响 表 1 显示, 与假手术组比较, 模型组收缩期左室末容积 (end-systolic volume, ESV) 升高 ($P < 0.05$); 模型组射血分数 (ejection fraction, EF)、左室短轴缩短率 (fractional endocardial shortening, FS) 明显减低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 参蛤散组和比索洛尔组大鼠 EF 值升高 ($P < 0.05$)。

尔组心肌组织形态接近假手术组。各组大鼠心脏 Masson 染色显示, 假手术组心肌细胞周围有少量胶原组织, 模型组及各治疗组部分心肌已被胶原组

织取代；模型组心肌细胞周围胶原组织明显增多，各治疗组介于假手术组和模型组之间。见图 2。

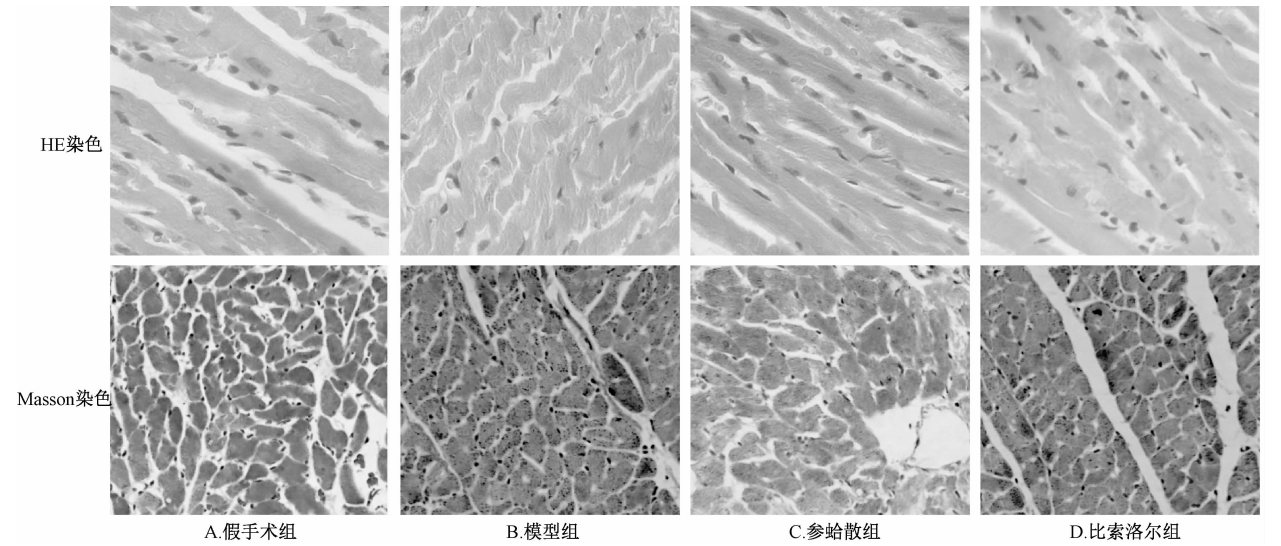


图 2 各组大鼠心肌病理学图 (HE, ×400; Masson, ×200)

Fig. 2 Myocardium histopathology images of rats in various groups (HE, ×400; Masson, ×200)

2.4 各组大鼠血清 BNP、ALD、Ang II 测定 结果见表 3。与假手术组相比，模型组大鼠血清 BNP、ALD、Ang II 值均上升，但无明显差异 ($P > 0.05$)。各治疗组与模型组血清 BNP、ALD、Ang II 比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠血清 BNP、ALD、Ang II 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of serum BNP, ALD and Ang II in rats in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	BNP/(ng·L ⁻¹)	ALD/(ng·L ⁻¹)	Ang II/(ng·L ⁻¹)
假手术组	347.4 ± 30.69	403.0 ± 28.55	574.7 ± 75.82
模型组	359.3 ± 30.54	407.4 ± 22.77	607.2 ± 58.26
参蛤散组	347.0 ± 33.19	399.2 ± 33.51	589.9 ± 85.58
比索洛尔组	342.8 ± 26.18	407.7 ± 23.92	611.7 ± 76.71

2.5 各组 PGC-1α、PPARα、NRF1 蛋白表达 相比于模型组，比索洛尔组 NRF1 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$)，见图 3。

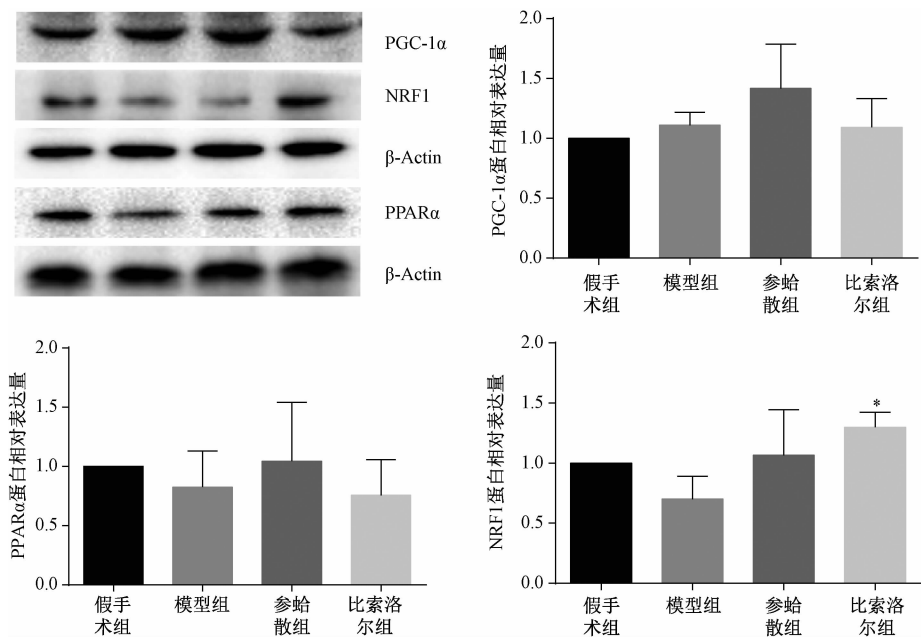
3 讨论

PGC-1α 是促进线粒体生物合成、调节线粒体数量和质量、参与脂肪酸氧化和产热作用的一个关键的核受体激活因子^[6]，它通过 NRF、ERR 等下游信号因子影响线粒体生物合成^[7]，调控线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM)；也可影响下游脂肪传感器 PPARs，通过调控脂肪代谢酶的转录来调控底物代谢。有研究提示，PGC-1α 轻度过表达对压力情况下的心脏可能是有益的^[8]，PGC-1α 表达的上调能保护心力衰竭大鼠心肌组织线粒体功能，促进线粒体生物合成，改善心力衰竭能量代谢^[9]。但对此也有学者提出

质疑，认为 PGC-1α 的过表达不能保护受损的线粒体及心肌收缩功能^[10]，在充血性心力衰竭的病人中也未见 PGC-1α 表达的减少^[11]。

参蛤散出自北宋《圣济总录》，原名独圣饼子，治疗肺气咳嗽、面肿、四肢浮，周端教授将其用于有肺系疾病或心力衰竭的患者，对喘促明显的疗效颇佳。考虑到药材价格不菲，为了提高利用程度，完整保存药性，“节省”药材，故常嘱患者将生晒参、蛤蚧打粉吞服。心力衰竭病人心肾阳衰，命门火衰，肾难主水，水邪凌心射肺，致喘咳、不能平卧，而人参味甘，大补元气；蛤蚧性微温，味咸，定喘纳气，两者补益心气，温补肺肾。

本研究采用腹主动脉缩窄致心力衰竭大鼠模型。在心力衰竭发展过程中，交感神经系统持续激活，导致 β1 肾上腺素能受体 (β1-adrenergic receptor, β1-AR) 信号通路异常^[12]，西药组比索洛尔是选择性的 β1-ARB (β1-AR 阻断剂)，能减轻心肌氧耗，改善心功能。参蛤散中的人参、蛤蚧经现代药理研究证实，人参能提高心衰患者心排血量，增加冠脉血流量，加快脂质代谢，增强心肌收缩力^[13]；蛤蚧能够解痉平喘，抗炎，调节免疫功能^[14]。本实验发现，参蛤散和比索洛尔对心力衰竭大鼠 EF、血压、左心功能均有不同程度的改善，与模型组相比，参蛤散升高心力衰竭大鼠 EF、dp/dt_{max} 和 dp/dt_{min}，显著降低腹主动脉缩窄大鼠 LV-EDP，证实参蛤散能减轻心脏前负荷，加强心肌收缩力，改善心力衰竭大鼠左室收缩、舒张功能。通



注：与模型组比较，**P* < 0.05

图 3 各组 Western blot 检测结果

Fig. 3 Western blot detection results in various groups

过 HE 及 Masson 染色的进一步观察发现，参蛤散能减少心肌组织病变，减轻基质水肿及心肌纤维化。参蛤散组 PGC-1α 蛋白表达量上升，但与模型组相比无明显差异，相关血清指标亦未出现明显差异，推测可能是模型时间尚短，心力衰竭早期 PGC-1α 保持正常或轻微增加，而在晚期或终末期心衰时，才出现显著下调。PGC-1α 的调控机制复杂，其上游影响因子众多，且目前它在心力衰竭和线粒体生物合成上的作用尚有争议，参蛤散改善心功能的效应及其是否有益于线粒体的生物合成有待后续更深入的研究。

参考文献：

[1] Lopaschuk G D, Spafford M A. Energy substrate utilization by isolated working hearts from newborn rabbits[J]. *Am J Physiol*, 1990, 258(2): H1274-H1280.

[2] Lopaschuk G D, Collins-Nakai R L, Itoi T. Developmental changes in energy substrate use by the heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1992, 26(12): 1172-1180.

[3] Palomer X, Salvadó L, Barroso E, *et al.* An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 3160-3172.

[4] 屈扬扬, 杨 霞, 刘 奔, 等. *N*-乙酰半胱氨酸对大鼠压力负荷型心肌肥厚的作用[J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21(4): 371-376.

[5] 刘 丽. 腹主动脉缩窄大鼠左室肥厚及替米沙坦、苯磺酸

氨氯地平预防肥厚的差异蛋白质组学研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2008, 14-15.

[6] Jeninga E H, Schoonjans K, Auwerx J. Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (33): 4617-4624.

[7] Uguccioni G, Hood D A. The importance of PGC-1α in contractile activity-induced mitochondrial adaptations[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300(2): E361-E371.

[8] Lehman J J, Barger P M, Kovacs A, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106 (7): 847-856.

[9] 张军芳. 芪苈强心胶囊对心力衰竭微血管损伤、心室重构及代谢重构的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.

[10] Pereira R O, Wende A R, Crum A, *et al.* Maintaining PGC-1α expression following pressure overload-induced cardiac hypertrophy preserves angiogenesis but not contractile or mitochondrial function[J]. *FASEB J*, 2014, 28(8): 3691-3702.

[11] Hu X L, Xu X, Lu Z B, *et al.* AMPKα2 regulates expression of estrogen-related receptor alpha, a metabolic transcription factor related to heart failure development[J]. *Hypertension*, 2011, 58(4): 696-703

[12] 付德明, 吕吉元, 蔡 衡, 等. 比索洛尔对慢性心力衰竭大鼠心肌 β₁ 肾上腺素能受体及心功能的调节作用[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(12): 1091-1096.

[13] 黎 阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. *中草药*, 2009, 40(1): 164-166.

[14] 廖成成, 臧 宁, 班建东, 等. 黑斑蛤蚧对哮喘模型小鼠的免疫调节的影响[J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2037-2040.